



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109709323 A
(43)申请公布日 2019.05.03

(21)申请号 201910115715.4

(22)申请日 2019.02.15

(71)申请人 深圳上泰生物工程有限公司
地址 518000 广东省深圳市光明新区光明
街道观光路3009号光明科技园A1栋9
楼

(72)发明人 陈小茹 肖桥斌 吴向东 周博

(74)专利代理机构 深圳鼎合诚知识产权代理有
限公司 44281
代理人 张海平 彭家恩

(51)Int.Cl.
G01N 33/543(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)

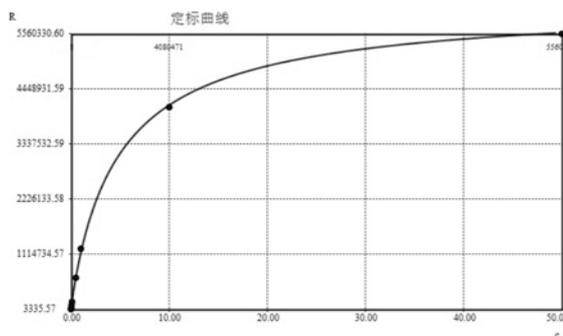
权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

高敏心肌肌钙蛋白I磁微粒化学发光免疫检测试剂盒、制备方法及应用

(57)摘要

本申请提供一种高敏心肌肌钙蛋白I(hs-cTnI)磁微粒化学发光免疫检测试剂盒,包括试剂R1、试剂R2、磁微粒工作液和cTnI抗原校准品,其中该试剂R1包含生物素标记的抗cTnI多克隆抗体,该试剂R2包含两株针对不同cTnI抗原表位的吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体,该磁微粒工作液包含链霉亲和素磁珠。该试剂盒还可包括H₂O₂溶液和碱溶液。本申请还提供了该试剂盒的制备方法和用途。本申请的试剂盒能对cTnI抗原的多个表位进行识别,大大提高了心肌肌钙蛋白I化学发光免疫检测试剂盒的分析灵敏度和精密



1. 一种高敏心肌肌钙蛋白I (hs-cTnI) 磁微粒化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 包括试剂R1、试剂R2、磁微粒工作液和cTnI抗原校准品, 其中所述试剂R1包含生物素标记的抗cTnI多克隆抗体, 所述生物素标记的抗cTnI多克隆抗体溶于捕获抗体稀释液中; 所述试剂R2包含两株针对不同cTnI抗原表位的吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体, 所述两株针对不同cTnI抗原表位的吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体的质量比为1:1, 溶于标记抗体稀释液中; 所述磁微粒工作液包含链霉亲和素磁珠, 所述链霉亲和素磁珠溶于磁珠稀释液中。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于, 所述生物素标记的抗cTnI多克隆抗体在所述试剂R1中的浓度为0.4-2 μ g/mL, 所述捕获抗体稀释液包含10-150mM Na₂HPO₄、10-150mM KH₂PO₄、50-200mM NaCl、50-200mM KCl、1-10mg/mL牛血清白蛋白(BSA)、0.01-0.2% (v/v) ProClin300、0.05%-0.2% (v/v) Tween-20, pH 6.50-8.50。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于, 所述两株针对不同cTnI抗原表位的吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体在所述试剂R2中的浓度为0.1-5 μ g/mL, 所述标记抗体稀释液包含10-150mM 2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)、1-10mg/mL牛血清白蛋白(BSA)、0.01-0.2% (v/v) ProClin300、0.05%-0.2% (v/v) Tween-20, pH 6.10-8.20。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于, 所述链霉亲和素磁珠在所述磁微粒工作液中的浓度为0.5-1mg/mL, 所述磁珠稀释液包含20-100mM Na₂HPO₄、20-100mM KH₂PO₄、50-180mM NaCl、50-180mM KCl、1-10mg/mL牛血清白蛋白(BSA)、0.05%-0.1% (v/v) ProClin300、0.05%-0.1% (v/v) Tween-20、1% (v/v) PEG、0.05-0.5% (w/v) 酪蛋白, pH 7.0-8.50。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于, 所述cTnI抗原校准品为通过将cTnI抗原加入到含有10-100mM Tris-HCl, 10-200mM NaCl, 10-200mM KCl, 5-50%小牛血清(v/v), 0.1-1%ProClin300(v/v), pH 6.5-8.5的稀释液中制得的浓度分别为0ng/mL、0.005ng/mL、0.01ng/mL、0.05ng/mL、0.08ng/mL、0.1ng/mL、0.5ng/mL、1.0ng/mL、5.0ng/mL、10.0ng/mL、50.0ng/mL的一系列cTnI抗原溶液。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的试剂盒, 其特征在于, 还包括H₂O₂溶液和碱溶液, 所述H₂O₂溶液的浓度为0.1%-1%, 所述碱溶液的浓度为0.1M-1M。

7. 根据权利要求6所述的试剂盒, 其特征在于, 所述碱溶液为NaOH溶液或者KOH溶液。

8. 一种制备根据权利要求1-7中任一项所述的试剂盒的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(1) 用生物素标记抗cTnI多克隆抗体, 其中抗cTnI多克隆抗体与生物素的质量比为5:1-20:1, 经脱盐纯化得到所述生物素标记的抗cTnI多克隆抗体;

(2) 将制备得到的所述生物素标记的抗cTnI多克隆抗体用所述捕获抗体稀释液配成0.4-2 μ g/mL的浓度, 得到所述试剂R1;

(3) 用吡啶酯标记两株针对不同cTnI抗原表位的抗cTnI单克隆抗体, 其中每株所述抗cTnI单克隆抗体与吡啶酯的质量比为5:1-20:1, 经脱盐纯化得到所述两株针对不同cTnI抗原表位的吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体;

(4) 将制备得到的所述两株针对不同cTnI抗原表位的吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体以质量比1:1混合, 然后用所述标记抗体稀释液配成0.1-5 μ g/mL的浓度, 得到所述试剂2;

(5) 用磁珠稀释液将链霉亲和素磁珠稀释至0.5-1mg/mL的浓度, 得到所述磁微粒工作

液；

(6) 将cTnI抗原加入到含有10-100mM Tris-HCl, 10-200mM NaCl, 10-200mM KCl, 5-50%小牛血清(v/v), 0.1-1%ProClin300(v/v), pH 6.5-8.5的稀释液中, 制得浓度分别为0ng/mL、0.005ng/mL、0.01ng/mL、0.05ng/mL、0.08ng/mL、0.1ng/mL、0.5ng/mL、1.0ng/mL、5.0ng/mL、10.0ng/mL、50.0ng/mL的cTnI抗原校准品；

(7) 将所述试剂R1、所述试剂R2、所述磁微粒工作液和所述cTnI抗原校准品连同试剂盒说明书装装在试剂盒包装中, 制得所述试剂盒。

9. 根据权利要求8所述的方法, 其特征在于, 还包括提供浓度为0.1%-1%的H₂O₂溶液和浓度为0.1M-1M的碱溶液, 并且将所述H₂O₂溶液和所述碱溶液装在试剂盒包装中, 制得所述试剂盒。

10. 根据权利要求1-7中任一项所述的试剂盒用于非治疗性检测心肌肌钙蛋白I含量的用途。

高敏心肌肌钙蛋白I磁微粒化学发光免疫检测试剂盒、制备方法 及用途

技术领域

[0001] 本发明涉及医疗检测技术领域,特别是磁微粒化学发光免疫检测技术领域,具体涉及一种高敏心肌肌钙蛋白I磁微粒化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 肌钙蛋白(troponin,Tn)复合物由肌钙蛋白I、肌钙蛋白T、肌钙蛋白C组成,能调节肌肉收缩。心肌肌钙蛋白I(cardiactroponin I,cTnI)是存在于心肌细胞中的一种肌钙蛋白I异构体,具有高度的心肌特异性,可用于鉴别心肌损伤和骨骼肌损伤相关的临床情形。急性心肌梗死(Acute Myocardial Infarction,AMI)是目前威胁人类生命的主要疾病之一。当心肌梗死或缺血而使心肌细胞受损时,cTnI迅速透过心肌细胞膜进入血液。因此,在发病初期,快速、灵敏且准确地测定人血中的cTnI及其变化趋势,对于急性心肌梗死的诊断和治疗有着重要的临床意义。

[0003] cTnI作为心肌损伤的首选标志物,目前临床检测常用的方法是化学发光免疫分析法,且目前主要采用磁微粒化学发光法,而发光方式则有酶促化学发光和直接化学发光两种。按照分析灵敏度和精密度的不同,cTnI化学发光免疫分析又可分为传统cTnI化学发光免疫分析和高敏cTnI(hs-cTnI)化学发光免疫分析。传统cTnI化学发光免疫分析的灵敏度为0.04-0.20ng/mL,而高敏化学发光免疫分析的灵敏度高达2.5pg/mL。传统cTnI化学发光免疫分析由于分析灵敏度的限制,在心肌梗死发病后4-6小时之内不能检测出cTnI浓度的变化,作出诊断则通常需要7小时。而高敏cTnI化学发光免疫分析在3-4小时之内即可作出诊断,未来更是可能研发出可在病人心肌梗死发病后1小时内作出诊断的高敏cTnI化学发光免疫分析仪器和试剂,将极大地促进急性心肌梗死的早诊断早治疗,为挽救病人的生命赢得宝贵的时间,降低心肌梗死对病人心脏的永久性损伤。

[0004] 目前,国产仪器和试剂已经占领了传统cTnI化学发光免疫分析领域相当的份额,而在高敏cTnI化学发光免疫分析领域仍然被国外厂家如罗氏、雅培、西门子、贝克曼所垄断,这是因为目前国产cTnI化学发光免疫分析试剂在分析灵敏度和精密度方面与高敏cTnI化学发光免疫分析的要求还有相当的距离。因此,开发研制出国产的分析灵敏度高和精密度高的高敏cTnI化学发光免疫分析试剂极为必要。

发明内容

[0005] 本发明旨在提供分析灵敏度高和精密度高的高敏cTnI化学发光免疫分析试剂盒,实现高敏cTnI化学发光免疫分析试剂的进口替代。

[0006] 因此,在一个方面,本发明提供一种高敏心肌肌钙蛋白I(hs-cTnI)磁微粒化学发光免疫检测试剂盒,该试剂盒包括试剂R1、试剂R2、磁微粒工作液和cTnI抗原校准品,其中该试剂R1包含生物素标记的抗cTnI多克隆抗体,该生物素标记的抗cTnI多克隆抗体溶于捕获抗体稀释液中;该试剂R2包含两株针对不同cTnI抗原表位的吡啶酯标记的抗cTnI单克隆

抗体,该两株针对不同cTnI抗原表位的吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体的质量比为1:1,溶于标记抗体稀释液中;该磁微粒工作液包含链霉亲和素磁珠,该链霉亲和素磁珠溶于磁珠稀释液中。

[0007] 该生物素标记的抗cTnI多克隆抗体作为捕获抗体,该两株针对不同cTnI抗原表位的吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体作为标记抗体。

[0008] 在本发明的具体实施方案中,试剂R1包含生物素标记的抗cTnI多克隆抗体和捕获抗体稀释液,生物素标记的抗cTnI多克隆抗体在试剂R1中的浓度为0.4-2 μ g/mL,捕获抗体稀释液包含10-150mM Na₂HPO₄、10-150mM KH₂PO₄、50-200mM NaCl、50-200mM KCl、1-10mg/mL牛血清白蛋白(BSA)、0.01-0.2% (v/v) ProClin300、0.05%-0.2% (v/v) Tween-20,pH 6.50-8.50。

[0009] 在本发明的具体实施方案中,试剂R2包含两株针对不同cTnI抗原表位的吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体和标记抗体稀释液,两株针对不同cTnI抗原表位的吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体在试剂R2中的浓度为0.1-5 μ g/mL,标记抗体稀释液包含10-150mM 2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)、1-10mg/mL牛血清白蛋白(BSA)、0.01-0.2% (v/v) ProClin300、0.05%-0.2% (v/v) Tween-20,pH 6.10-8.20。

[0010] 在本发明的具体实施方案中,磁微粒工作液包含链霉亲和素磁珠和磁珠稀释液,链霉亲和素磁珠在磁微粒工作液中的浓度为0.5-1mg/mL,磁珠稀释液包含20-100mMNa₂HPO₄、20-100mM KH₂PO₄、50-180mM NaCl、50-180mM KCl、1-10mg/mL牛血清白蛋白(BSA)、0.05%-0.1% (v/v) ProClin300、0.05%-0.1% (v/v) Tween-20、1% (v/v) PEG、0.05-0.5% (w/v) 酪蛋白,pH 7.0-8.50。

[0011] 在本发明的优选实施方案中,该试剂盒还包括cTnI抗原校准品。具体地,该cTnI抗原校准品为通过将cTnI抗原加入到含有10-100mM Tris-HCl,10-200mM NaCl,10-200mM KCl,5-50%小牛血清(v/v),0.1-1%ProClin300(v/v),pH 6.5-8.5的稀释液中制得的浓度分别为0ng/mL、0.005ng/mL、0.01ng/mL、0.05ng/mL、0.08ng/mL、0.1ng/mL、0.5ng/mL、1.0ng/mL、5.0ng/mL、10.0ng/mL、50.0ng/mL的一系列cTnI抗原溶液。

[0012] 该cTnI抗原校准品用于制作校准曲线,以便对待测样本中的cTnI抗原进行定量检测。

[0013] 在本发明的优选实施方案中,该试剂盒还包含H₂O₂溶液。H₂O₂溶液的浓度优选为0.1%-1%。

[0014] H₂O₂溶液用于在使用该试剂盒的试剂R1、试剂R2和磁微粒工作液与待测样本中的cTnI抗原形成“链霉亲和素磁珠-生物素标记的抗cTnI多克隆抗体-待测cTnI抗原-吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体”磁珠复合物后,加入到磁珠复合物中,并在加入碱溶液使磁珠复合物处于碱性环境后,与磁珠复合物中的吡啶酯发生反应而发光,由此实现待测样本中的cTnI抗原的定量检测。

[0015] 当然,H₂O₂溶液也可以由本发明试剂盒的使用者另外现成配制,因此,H₂O₂溶液不是本发明试剂盒的必需组分,但从方便使用的角度,优选在本发明试剂盒中包含H₂O₂溶液。

[0016] 在本发明的优选实施方案中,该试剂盒还包含碱溶液。碱溶液优选为NaOH溶液或者KOH溶液。碱溶液的浓度优选为0.1M-1M。

[0017] 碱溶液用于在使用该试剂盒的试剂R1、试剂R2和磁微粒工作液与待测样本中的

cTnI抗原形成“链霉亲和素磁珠-生物素标记的抗cTnI多克隆抗体-待测cTnI抗原-吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体”磁珠复合物并向该磁珠复合物加入H₂O₂后,加入体系中使该磁珠复合物处于碱性环境,以使H₂O₂与磁珠复合物中的吡啶酯发生反应而发光,由此实现待测样本中的cTnI抗原的定量检测。

[0018] 当然,碱溶液也可以由本发明试剂盒的使用者另外现成配制,因此,碱溶液不是本发明试剂盒的必需组分,但从方便使用的角度,优选在本发明试剂盒中包含碱溶液。

[0019] 在第二方面,本发明提供制备第一方面的高敏心肌肌钙蛋白I (hs-cTnI) 磁微粒化学发光免疫检测试剂盒的方法,该方法包括以下步骤:

[0020] (1) 用生物素标记抗cTnI多克隆抗体,其中抗cTnI多克隆抗体与生物素的质量比为5:1-20:1,经脱盐纯化得到该生物素标记的抗cTnI多克隆抗体;

[0021] (2) 将制备得到的该生物素标记的抗cTnI多克隆抗体用该捕获抗体稀释液配成0.4-2μg/mL的浓度,得到该试剂R1;

[0022] (3) 用吡啶酯标记两株针对不同cTnI抗原表位的抗cTnI单克隆抗体,其中每株该抗cTnI单克隆抗体与吡啶酯的质量比为5:1-20:1,经脱盐纯化得到该两株针对不同cTnI抗原表位的吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体;

[0023] (4) 将制备得到的该两株针对不同cTnI抗原表位的吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体以质量比1:1混合,然后用该标记抗体稀释液配成0.1-5μg/mL的浓度,得到该试剂R2;

[0024] (5) 用磁珠稀释液将链霉亲和素磁珠稀释至0.5-1mg/mL的浓度,得到该磁微粒工作液;

[0025] (6) 将cTnI抗原加入到含有10-100mM Tris-HCl,10-200mM NaCl,10-200mM KCl,5-50%小牛血清(v/v),0.1-1%ProClin300(v/v),pH 6.5-8.5的稀释液中,制得浓度分别为0ng/mL、0.005ng/mL、0.01ng/mL、0.05ng/mL、0.08ng/mL、0.1ng/mL、0.5ng/mL、1.0ng/mL、5.0ng/mL、10.0ng/mL、50.0ng/mL的cTnI抗原校准品;

[0026] (7) 将该试剂R1、该试剂R2、该磁微粒工作液和该cTnI抗原校准品连同试剂盒说明书装在试剂盒包装中,制得该试剂盒。

[0027] 在本发明的优选实施方案中,该方法还包括提供浓度为0.1%-1%的H₂O₂溶液和浓度为0.1M-1M的碱溶液,并且将该H₂O₂溶液和该碱溶液装在试剂盒包装中,制得该试剂盒。

[0028] 在第三方面,本发明提供第一方面的试剂盒用于检测心肌肌钙蛋白I的用途。尤其是,该试剂盒用于非治疗性检测心肌肌钙蛋白I含量。

[0029] 该试剂盒基于抗体夹心法和直接化学发光法来检测待测样本中的cTnI抗原。试剂R1中的生物素标记的抗cTnI多克隆抗体和试剂R2中的两株针对不同cTnI抗原表位的吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体与待测样本中的cTnI抗原发生免疫反应后,形成“生物素标记的抗cTnI多克隆抗体-待测cTnI抗原-吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体”免疫复合物,该免疫复合物与链霉亲和素磁珠反应后,形成“链霉亲和素磁珠-生物素标记的抗cTnI多克隆抗体-待测cTnI抗原-吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体”磁珠复合物,可以方便地通过磁场将该磁珠复合物分离纯化。向该磁珠复合物加入H₂O₂溶液并加入NaOH溶液使体系处于碱性环境,吡啶酯与H₂O₂反应而发光。发光强度与待测样本中的cTnI抗原的量成正比,通过化学发光分析仪测定发光强度,可以得知待测样本中的cTnI抗原的量。

[0030] 本发明的有益效果:

[0031] 本发明使用生物素标记的抗cTnI多克隆抗体作为捕获抗体,两株针对不同cTnI抗原表位的吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体以质量比1:1混合作为标记抗体,因而能对cTnI抗原的多个表位进行识别,避免了使用单一抗体时因为cTnI抗原的快速降解而未能被抗体有效识别的缺陷,大大提高了分析灵敏度和精密度,提供了一种检测结果稳定、灵敏度高、精密度高、检测范围宽、成本低、适用于高敏cTnI化学发光免疫分析临床应用的检测试剂盒。

附图说明

[0032] 图1显示本发明实施例1的高敏心肌肌钙蛋白I (hs-cTnI) 磁微粒化学发光免疫检测试剂盒的校准曲线。

具体实施方式

[0033] 下面通过具体实施例对本发明作进一步详细说明。这些实施例旨在对本发明做示例性的说明,并不意在以任何方式限制本发明。

[0034] 实施例1——高敏心肌肌钙蛋白I (hs-cTnI) 磁微粒化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0035] 1. 试剂R1的制备

[0036] A. 生物素标记的抗cTnI多克隆抗体的制备:将抗cTnI多克隆抗体 (HyTest) 用缓冲液稀释至2mg/mL的浓度,与生物素混合后室温反应1-3小时以进行生物素标记。抗cTnI多克隆抗体与生物素的质量比为5:1-20:1,其中生物素过量,以对抗cTnI多克隆抗体充分地进行标记。缓冲液的组成为5-50mM Na₂CO₃+10-100mM NaHCO₃, pH 8.0-10.5。标记完成后用 Thermo Scientific Zeba™ Spin Desalting Columns进行离心脱盐纯化,得到生物素标记的抗cTnI多克隆抗体,保存在4℃下备用。

[0037] B. 将制备得到的生物素标记的抗cTnI多克隆抗体用捕获抗体稀释液配成1μg/mL的浓度,得到试剂R1。捕获抗体稀释液包括:缓冲剂、电解质、封闭剂、防腐剂、表面活性剂,具体组成如下表1,其中Na₂HPO₄和KH₂PO₄作为缓冲剂,NaCl和KCl作为电解质、牛血清白蛋白 (BSA) 作为封闭剂、ProClin300作为防腐剂,防止试剂中微生物的生长,Tween-20作为表面活性剂。

[0038] 表1实施例1的捕获抗体稀释液的组成

	Na ₂ HPO ₄	100 mM
	KH ₂ PO ₄	100 mM
	NaCl	100 mM
	KCl	100 mM
[0039]	牛血清白蛋白(BSA)	5 mg/mL
	ProClin300	0.1% (w/v)
	Tween-20	0.1% (w/v)
	pH	7.50

[0040] 2. 试剂R2的制备

[0041] A. 吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体的制备: 将两株针对不同cTnI抗原表位的抗cTnI单克隆抗体 (Medix) 分别用5-100mM, pH 6-8.5 PBS缓冲液稀释至2mg/mL的浓度, 与吡啶酯混合后在室温反应10-60分钟以进行吡啶酯标记。每株抗cTnI单克隆抗体与吡啶酯的质量比为10:1, 其中吡啶酯过量, 可以对每株抗cTnI单克隆抗体充分地进行标记。标记完成后用Thermo Scientific Zeba™ Spin Desalting Columns进行离心脱盐纯化, 分别得到两株针对不同cTnI抗原表位的吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体。

[0042] B. 将制备得到的两株针对不同cTnI抗原表位的吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体以质量比1:1混合, 然后用标记抗体稀释液配成1 μ g/mL的浓度, 得到试剂2。标记抗体稀释液包括: 缓冲剂、封闭剂、防腐剂、表面活性剂, 具体组成如下表2, 其中2-(N-吗啉) 乙磺酸 (MES) 作为缓冲剂, 牛血清白蛋白 (BSA) 作为封闭剂, ProClin300作为防腐剂、Tween-20作为表面活性剂。

[0043] 表2 实施例1的标记抗体稀释液的组成

	2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)	100 mM
	牛血清白蛋白(BSA)	5 mg/mL
[0044]	ProClin300	0.1% (w/v)
	Tween-20	0.1% (w/v)
	pH	7.20

[0045] 3. 磁微粒工作液的制备

[0046] 取直径0.2-2 μ m链霉亲和素磁珠, 用磁珠稀释液稀释至0.8mg/mL的浓度。磁珠稀释液包含缓冲剂、电解质、阻断剂、防腐剂、表面活性剂, 具体组成如下表3, 其中Na₂HPO₄和KH₂PO₄作为缓冲剂, NaCl和KCl作为电解质、牛血清白蛋白 (BSA) 作为封闭剂、ProClin300作为防腐剂, 防止试剂中微生物的生长, Tween-20作为表面活性剂, PEG作为稳定剂, 酪蛋白作为封闭剂。

[0047] 表3. 实施例1的磁珠稀释液的组成

	Na ₂ HPO ₄	50 mM
	KH ₂ PO ₄	50 mM
	NaCl	100 mM
	KCl	100 mM
	牛血清白蛋白(BSA)	5 mg/mL
[0048]	ProClin300	0.1% (w/v)
	Tween-20	0.1% (w/v)
	PEG	1% (v/v)
	酪蛋白	0.1% (w/v)
	pH	8.0

[0049] 4. cTnI抗原校准品的制备

[0050] cTnI抗原校准品的制备方法如下:按照所需浓度,将计算量的cTnI抗原加入到含有10-100mM Tris-HCl,10-200mM NaCl,10-200mM KCl,5-50%小牛血清(v/v),0.1-1% ProClin300(v/v),pH 6.5-8.5的稀释液中,制得浓度分别为0ng/mL、0.005ng/mL、0.01ng/mL、0.05ng/mL、0.08ng/mL、0.1ng/mL、0.5ng/mL、1.0ng/mL、5.0ng/mL、10.0ng/mL、50.0ng/mL的一系列cTnI抗原溶液。

[0051] 5. 另外,配制0.1%-1% H_2O_2 和0.1M-1M NaOH溶液。将制备得到的试剂R1、试剂R2、磁微粒工作液、cTnI抗原校准品、 H_2O_2 溶液和碱溶液分装到合适的试剂瓶中,连同试剂盒说明书装在试剂盒包装中,制得试剂盒产品。

[0052] 实施例2——高敏心肌肌钙蛋白I (hs-cTnI) 磁微粒化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0053] 本实施例的制备方法与实施例1类似,但有以下不同:

[0054] 1. 试剂R1的制备

[0055] 制备得到的生物素标记的抗cTnI多克隆抗体用捕获抗体稀释液配成0.4 μ g/mL的浓度。捕获抗体稀释液的组成如下表4所示。

[0056] 表4实施例2的捕获抗体稀释液的组成

	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	10 mM
	NaCl	50 mM
	KCl	50 mM
[0057]	牛血清白蛋白(BSA)	1 mg/mL
	ProClin300	0.01% (w/v)
	Tween-20	0.05% (w/v)
	pH	6.50

[0058] 2. 试剂R2的制备

[0059] 制备得到的两株针对不同cTnI抗原表位的吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体以质量比1:1混合,然后用标记抗体稀释液配成0.5 μ g/mL的浓度。标记抗体稀释液的组成如下表5所示。

[0060] 表5实施例2的标记抗体稀释液的组成

	2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)	10 mM
	牛血清白蛋白(BSA)	1 mg/mL
[0061]	ProClin300	0.01% (w/v)
	Tween-20	0.05% (w/v)
[0062]	pH	6.10

[0063] 3. 磁微粒工作液的制备

[0064] 链霉亲和素磁珠用磁珠稀释液稀释至0.5mg/mL的浓度。磁珠稀释液的组成如下表

6所示。

[0065] 表6. 实施例2的磁珠稀释液的组成

	Na ₂ HPO ₄	20 mM
	KH ₂ PO ₄	20 mM
	NaCl	50 mM
	KCl	50 mM
	牛血清白蛋白(BSA)	1 mg/mL
[0066]	ProClin300	0.05% (w/v)
	Tween-20	0.05% (w/v)
	PEG	1% (v/v)
	酪蛋白	0.05% (w/v)
	pH	7.0

[0067] 实施例3——高敏心肌钙蛋白I (hs-cTnI) 磁微粒化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0068] 本实施例的制备方法与实施例1类似, 但有以下不同:

[0069] 1. 试剂R1的制备

[0070] 制备得到的生物素标记的抗cTnI多克隆抗体用捕获抗体稀释液配成2μg/mL的浓度。捕获抗体稀释液的组成如下表7所示。

[0071] 表7实施例3的捕获抗体稀释液的组成

	Na ₂ HPO ₄	150 mM
	KH ₂ PO ₄	150 mM
	NaCl	200 mM
	KCl	200 mM
[0072]	牛血清白蛋白(BSA)	10 mg/mL
	ProClin300	0.2% (w/v)
	Tween-20	0.2% (w/v)
	pH	8.50

[0073] 2. 试剂R2的制备

[0074] 制备得到的两株针对不同cTnI抗原表位的吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体以质量比1:1混合, 然后用标记抗体稀释液配成5μg/mL的浓度。标记抗体稀释液的组成如下表8所示。

[0075] 表8实施例3的标记抗体稀释液的组成

	2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)	150 mM
	牛血清白蛋白(BSA)	10 mg/mL
[0076]	ProClin300	0.2% (w/v)
	Tween-20	0.2% (w/v)
	pH	8.20

[0077] 3. 磁微粒工作液的制备

[0078] 链霉亲和素磁珠用磁珠稀释液稀释至1mg/mL的浓度。磁珠稀释液的组成如下表9所示。

[0079] 表9. 实施例3的磁珠稀释液的组成

	Na ₂ HPO ₄	100 mM
	KH ₂ PO ₄	100 mM
	NaCl	180 mM
	KCl	180 mM
	牛血清白蛋白(BSA)	10 mg/mL
[0080]	ProClin300	0.1% (w/v)
	Tween-20	0.1% (w/v)
	PEG	1% (v/v)
	酪蛋白	0.5% (w/v)
	pH	8.50

[0081] 检测例1——cTnI抗原的定量检测

[0082] 本检测例使用实施例2制备得到的高敏心肌肌钙蛋白I (hs-cTnI) 磁微粒化学发光免疫检测试剂盒,对cTnI抗原进行定量检测。

[0083] 先取该试剂盒的浓度分别为0ng/mL、0.005ng/mL、0.01ng/mL、0.05ng/mL、0.1ng/mL、0.5ng/mL、1.0ng/mL、10.0ng/mL、50.0ng/mL的cTnI抗原校准品制作校准曲线。以下操作都由化学发光免疫分析仪自动完成。具体地讲,化学发光免疫分析仪将100μL试剂R1、100μL试剂R2和100μL特定浓度的cTnI抗原标准品混合均匀,在37℃下孵育10分钟,以形成“生物素标记的抗cTnI多克隆抗体-cTnI抗原-吖啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体”免疫复合物。然后加入20μL链霉亲和素磁珠,混合均匀,孵育10分钟,然后用含有吐温的磷酸盐缓冲液清洗去除游离的抗体,得到“链霉亲和素磁珠-生物素标记的抗cTnI多克隆抗体-cTnI抗原-吖啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体”磁珠复合物。向该磁珠复合物中加入0.1%-1% H₂O₂,并加入0.1M-1M NaOH溶液后化学发光免疫分析仪即时读取相应的发光值。将校准品浓度和测得的发光值输入到对应的定标参数中,再以浓度为0.08ng/mL、5ng/mL的cTnI校准品作为C1、C2定标,选用四参数法,化学发光免疫分析仪即生成校准曲线(图1)。定标后,化学发光免疫分析仪即能测出样本中所含的cTnI抗原的浓度。

[0084] 检测例2——试剂盒的分析灵敏度和精密度

[0085] 本检测例考察实施例2制备得到的高敏心肌肌钙蛋白I (hs-cTnI) 磁微粒化学发光免疫检测试剂盒的分析灵敏度和精密度。

[0086] 1. 分析灵敏度

[0087] 依据美国临床实验室标准化委员会/临床和实验室标准协会 (NCCLS/CLSI) 的 EP17-A 文件 (CLSI EP17 A Ed.1 Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation (确定最低检出限和定量限的方案)), 对浓度为 0ng/mL 的 cTnI 抗原校准品进行 25 次重复测试。25 次重复测试的平均发光值加上 2 个标准偏差的发光值所对应的 cTnI 抗原浓度水平即为最低检出限 LoD (分析灵敏度)。经测定, 实施例 4 制备得到的试剂盒的分析灵敏度为 0.002ng/mL。将变异系数 $\leq 10\%$ 时测定的最低 cTnI 抗原浓度定义为定量限 LoQ (功能灵敏度)。该试剂盒的功能灵敏度为 0.01ng/mL, 可测定浓度高达 50ng/mL。

[0088] 传统 cTnI 化学发光免疫分析的灵敏度为 0.04-0.20ng/mL, 而高敏化学发光免疫分析的灵敏度高达 2.5pg/mL。可见, 实施例 4 制备得到的试剂盒的灵敏度远高于传统 cTnI 化学发光免疫分析, 与高敏化学发光免疫分析的灵敏度相当, 表明本发明的高敏心肌肌钙蛋白 I (hs-cTnI) 磁微粒化学发光免疫检测试剂盒可望实现国外高敏 cTnI 化学发光免疫分析试剂的进口替代。

[0089] 2. 分析精密度

[0090] 依据 NCCLS/CLSI 的 EP5-A2 文件 (EP5-A 2 Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (定量测量方法的精密度性能评价)), 采用 3 批试剂, 对浓度分别为 0.005ng/mL、0.01ng/mL、0.02ng/mL、0.2ng/mL、1ng/mL、50ng/mL 的 6 份 cTnI 抗原校准品每天上下午各检测一次, 共进行 20 天, 得到批内变异系数及总体变异系数, 结果见表 10。

[0091] 表 10: 3 批试剂的批内变异系数及总体变异系数

[0092]

cTnI 抗原校准品浓度(ng/mL)	0.005	0.01	0.02	0.2	1.0	50
批试剂 1 均值	0.0048	0.011	0.019	0.21	1.08	48.9
批试剂 1 标准偏差	0.0005	0.001	0.0012	0.009	0.026	3.2
批内变异系数(%)	10.4	9.1	6.32	4.29	2.41	6.54
批试剂 2 均值	0.0051	0.0097	0.021	0.208	0.96	51.3
批试剂 2 标准偏差	0.0005	0.0008	0.0012	0.013	0.031	2.7
批内变异系数(%)	9.8	8.25	5.71	6.25	3.23	5.26
批试剂 3 均值	0.0049	0.0099	0.0196	0.215	1.05	54.5
批试剂 3 标准偏差	0.0005	0.0007	0.0011	0.012	0.029	3.1
批内变异系数(%)	10.2	7.1	5.61	5.58	2.76	5.69
总体变异系数(%)	11.3	9.3	6.94	6.47	3.85	7.12

[0093] 由上表可见,当cTnI抗原校准品浓度还很低(0.01ng/mL)时,批内变异系数和总体变异系数均小于10%,数据的分析精密度高。

[0094] 以上应用了具体实例对本发明进行了阐述,只是用于帮助理解本发明,并不用以限制本发明。本发明所属技术领域的技术人员依据本发明的构思,还可以做出若干简单推演、变形或替换。这些推演、变形或替换方案也落入本发明的权利要求范围内。

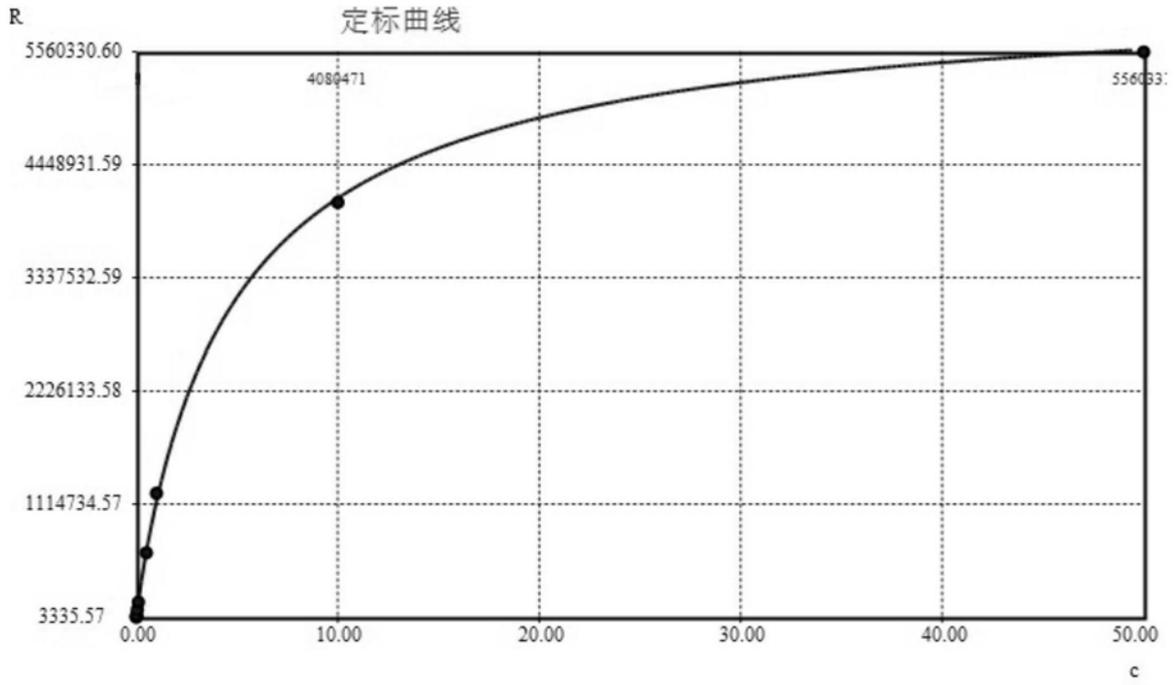


图1